家蚕对马尾松毛虫质型多角体病毒的敏感性

洪靖君[1,2]，段家龙[1]，赵淑玲[2]，彭辉银[2*]
（1. 安徽农业大学蚕业丝绸系，合肥 230036；2. 中国科学院武汉病毒研究所生物防治室，武汉 430071）

摘要：用虫体克隆技术，对马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株（DpCPV-HN）进行了分离纯化，鉴定为质型多角体病毒1型。以家蚕春蕾×镇珠杂种 F_1 代及自交的 F_2 代4或5日龄幼虫进行毒力测定，以纯化的家蚕质型多角体病毒对 F_1 代幼虫的毒力测定为对照。结果表明：家蚕品种春蕾×镇珠对家蚕质型多角体病毒敏感，马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株能引起其感染发病；马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染家蚕品种春蕾×镇珠 F_1 代幼虫和 F_2 代幼虫28天后的半致死剂量（LD_{50}）分别为885个和18个CPB（质多角体），前者为后者的49倍。马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染后的家蚕，其结茧率、化蛹率、羽化率、全茧量、茧层量和单蛾产卵数均有所下降，全茧量、茧层量、茧层率和单蛾产卵数与病毒感染剂量之间无显著关联。

关键词：马尾松毛虫质型多角体病毒；家蚕质型多角体病毒；家蚕；敏感性；虫体克隆
中图分类号：Q965.9 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2003）04-0409-08

The sensitivity of *Bombyx mori* larvae to *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus

HONG Jing-Jun[1,2]，DUAN Jia-Long[1]，ZHAO Shu-Ling[2]，PENG Hui-Yin[2*]（1. Department of Sericulture and Silk-Fashion，Anhui Agricultural University，Hefei 230036，China；2. Laboratory of Biological Control，Wuhan Institute of Virology，Chinese Academy of Sciences，Wuhan 430071，China）

Abstract: *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus strain Hunan（DpCPV-HN）was cloned *in vivo* and identified as a type 1 cypovirus. Fourth- or 5th-day post-hatching F_1 and F_2 silkworms from an generation F_1 that had previously been infected by DpCPV-HN，and two other type 1 cypoviruses from *Bombyx mori*（BmCPV-1）and *D. punctatus*（DpCPV-HN）were selected for the infection test. The results indicate that the breed of *B. mori* tested in this study was very sensitive to BmCPV-1，and could also be infected by DpCPV-HN. Based on the accumulative total mortalities of F_1 and F_2 generations of *B. mori* infected by DpCPV-HN over 28 days post-infection，the 50% lethal doses（LD_{50}）of DpCPV-HN of F_1 and F_2 generations were 885 and 18 CPBs respectively. Obviously，the F_2 silkworm larvae from DpCPV-infected generation F_1 were more sensitive to DpCPV-HN than those of the F_1 generation. However，the sensitivity of the F_2 generation to DpCPV-HN was still inferior to that of the F_1 to BmCPV-1. To some degree，the ratio of cocoons，ratio of pupae，ratio of moths to pupae，cocoon weight，cocoon shell weight，ratio of cocoon shell weight，and number of eggs from single female moths of the F_1 and F_2 generations were affected after infection by DpCPV-HN. The correlations between cocoon weight，cocoon shell weight，ratio of cocoon shell weight，number of eggs from single female moths of silkworms and inoculation doses of DpCPV-HN were not obvious.

Key words: DpCPV-HN；BmCPV-1；*Bombyx mori*；sensitivity；*in vivo* cloning

松毛虫是我国林业的一大害虫，我国共有27个种类（含4个亚种），每年造成巨大的林业资源和经济损失（王琼等，2002）。因此，每年各地要投入不少的人力和物力进行防治。昆虫质型多角体病毒（cytoplasmic polyhedrosis virus，CPV）隶属呼肠孤病毒科（Reoviridae）质型多角体病毒属 *Cypovirus*

基金项目：科学技术部重点项目（K2000-03-35）；云南省院合作项目（200YKS02）
作者简介：洪靖君，男，1977年生，安徽歙县人，硕士研究生，从事质型多角体病毒生物学及分子生物学研究，E-mail：jingjunhong@163.com
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：penghy@pentium.whiov.ac.cn
收稿日期 Received：2002-08-09；接受日期 Accepted：2003-03-12

（Francki *et al*.，1991；Holmes *et al*.，1995），感染昆虫中肠上皮细胞（Payne and Mertens，1983；Belloncik，1989），其突出特点是慢性感染，持续感染效果非常好，容易造成害虫流行病，因而特别适合生长周期长的森林害虫的防治，所以赤松毛虫 *Dendrolimus spectabilis* 质型多角体病毒1型（DsCPV-1）1974年在日本成为世界上第一个注册使用的昆虫质型多角体病毒杀虫剂。已有的研究表明，不同来源的松毛虫质型多角体病毒均可以引起常见种类的松毛虫感染发病，因此可用于松毛虫灾害的治理，并且松毛虫质型多角体病毒作为一种生物杀虫剂，已成为松毛虫综合防治中的重要武器（陈昌洁等，1988；陈昌洁，1990）。

家蚕 *Bombyx mori* 质型多角体病毒（BmCPV）病是养蚕生产上重大的蚕病之一。黄君霆（1979）报道家蚕品种间对家蚕质型多角体病毒感染抵抗性存在差异，且抵抗性与茧质（全茧量、茧层量和茧层率）无显著相关性。徐安英等（2002）对281个家蚕品种资源进行了抗家蚕质型多角体病毒比较试验，发现不同品种间抵抗性差异较大，最高达到千倍以上；不同地理系统间抵抗性差异数百倍。已有的研究表明，家蚕质型多角体病毒1型（BmCPV-1）可以感染赤松毛虫，而赤松毛虫质型多角体病毒1型也可以引起家蚕感染发病（吕鸿声，2001）。马尾松毛虫 *D*. *punctatus* 属鳞翅目（Lepidoptera）枯叶蛾科（Lasiocampidae），主要分布于我国江南各省，河南和陕西也有分布。1973年，中山大学和广东省林业科学研究所在广州市郊首次发现马尾松毛虫质型多角体病毒（DpCPV），其后，中山大学生物系昆虫专业电镜室（1976）对其病毒形态结构、组织病理和理化特性等进行了研究。根据质型多角体病毒电泳分型的方法（Payne and Rivers，1976），将其归属为质型多角体病毒1型（陶粮等，1988；陈昌洁，1990）。沈中建等（1994）曾报道马尾松毛虫质型多角体病毒对家蚕细胞系（Bm-N）的致细胞病变效应（cytopathic effect，CPE），即在感染24 h后，细胞开始明显扩大，大部分细胞内出现空泡或网状结构，进而细胞破裂、解体。因此，松毛虫质型多角体病毒作为杀虫剂在防治松毛虫的同时，有必要考虑在养蚕区是否会对蚕业生产造成损失。本研究以家蚕品种春蕾×镇珠为研究材料，探讨家蚕对马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株（DpCPV-HN）的敏感性。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与病毒

马尾松毛虫幼虫采自湖北省大悟县泉水寨林场；家蚕品种春蕾×镇珠杂种 F_1 代，由华中农业大学天敌昆虫资源研究所提供；马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株（DpCPV-HN）由本实验室保藏；家蚕质型多角体病毒1型（BmCPV-1）由本所中国普通病毒保藏中心（China Center of General Virus Culture Collections，CCGVCC）提供。

1.2 在马尾松毛虫体内克隆马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株

我们首次将虫体克隆的方法（Smith and Crook，1988）用于马尾松毛虫质型多角体病毒的分离与纯化。从被马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染致死的单虫尸中分离出病毒原毒株，经差速离心2～3次纯化多角体，并制成100 CPB/mL（每毫升病毒液含100个质多角体）的添毒液，将新鲜松针浸润其中，片刻取出，风干，添毒经饥饿8～10 h的3龄马尾松毛虫健康幼虫，12 h后更换新鲜松针，单虫饲育，单虫收集感染13～18天后出现典型质多角体病的虫尸或幼虫，－20℃冻存。

1.3 马尾松毛虫质型多角体病毒基因组dsRNA的抽提及其电泳

单虫收集的虫尸经解剖取出中肠并磨碎，经差速离心纯化多角体，采用SDS-热酚法（pH 8.0）从病毒粒子中纯化RNA，乙醇沉淀核酸，溶解于DEPC处理的双蒸水中，然后在5%的聚丙烯酰胺凝胶（Payne and Rivers，1976）或0.8%琼脂糖凝胶上电泳，凝胶成像系统处理电泳结果。

1.4 马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染家蚕杂种 F_1 代幼虫

将虫体克隆纯化后的多角体制成 0.5×10^6、0.5×10^5、0.5×10^4、0.5×10^3 及 0.5×10^2 CPB/mL 5种浓度的添毒液，按每虫20 μL的量，分别将5种浓度的多角体添毒液滴于直径为5 mm的新鲜桑叶上，待风干后，添毒经饥饿8～10 h的4或5日龄家蚕幼虫，每种浓度处理60头幼虫，并以家蚕质型多角体病毒添毒作为对照。以清水添食的90头幼虫作为空白对照。生物测定在温度（25±0.5）℃，相对湿度80%～90%的LRH-250-G光照培养箱中进行，幼虫于6孔生测板中单虫饲育。添毒36 h，待叶片80%以上被取食后，更换新鲜叶片，

以后稚蚕每 24 h、壮蚕每 12 h 更换一次新鲜叶片，每次给足叶量，逐天观察并记录，统计幼虫死亡情况。对于未被感染致死的幼虫，让其结茧、化蛹、羽化，乃至处理组内交配及产卵，对各处理分别进行结茧率、化蛹率、羽化率、全茧量、茧层量、茧层率及单蛾产卵数等的调查和统计。随机抽取 10 颗茧（不足 10 颗茧的按实数计），调查全茧量和茧层量，求其平均值；调查单蛾产卵数时处理组内随机配成 5 对（不足 5 对的按实数计），计数每母蛾的产卵数。其中 0.5×10^2 CPB/mL 处理孵化出的幼虫用于马尾松毛虫质型多角体病毒对 F_2 代的毒力试验。

1.5　马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染 F_2 代幼虫

与上述 1.4 不同步，以同样的马尾松毛虫质型多角体病毒及浓度梯度，按 1.4 所述的方法对 F_2 代幼虫（F_1 代已被 DpCPV-HN 感染）进行毒力测定，同时分别设清水添食的 60 头 F_2 代幼虫（F_1 代已被 DpCPV-HN 感染）和 60 头 F_2 代正常幼虫为试验对照。

2　结果与分析

2.1　马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株原毒株及经虫体克隆后的病毒基因组电泳分析

马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株经马尾松毛虫虫体克隆后，其基因组电泳谱型未发生变化，均为质型多角体病毒 1 型（图 1）。与家蚕质型多角体病毒 1 型极为相似（图 2），这与 Mertens 等（1989）的报道结果是一致的，反映了两者之间亲密的遗传关系。

2.2　家蚕对马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株的敏感性

2.2.1　感染时间对数值-幼虫累计死亡率机率值回归分析：图 3 反映了家蚕质型多角体病毒感染家蚕春蕾 × 镇珠杂种 F_1 代 4 或 5 日龄幼虫的累计死亡率随感染时间的变化关系。1、10、10^2、10^3 和 10^4 CPB 的家蚕质型多角体病毒感染 F_1 代幼虫，在感染 32 天后幼虫死亡率分别为 58.3%、73.3%、81.7%、88.3% 和 98.3%，与此相应的空白对照幼虫死亡率为 1.1%。由此可知，家蚕品种春蕾 × 镇珠对家蚕质型多角体病毒敏感。10^4 CPB 的家蚕质型多角体病毒添毒 F_1 代幼虫，添毒 12、16、20、24 和 28 天，校正死亡率分别为 20.0%、48.3%、66.7%、76.7% 和 91.6%，将上述的感染时间分别取对数值，校正死亡率分别转换为机率值，求得 LT-p 回归方程为 $Y = -2.0610 + 5.7715X$，相关系数 $r = 0.992$，进一步求出 50% 和 90% 致死时间分别为 16.7 天和 27.9 天。

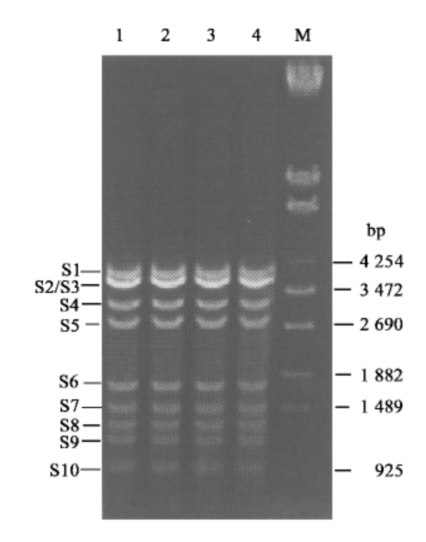


图 1　马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1　Electrophoresis of DpCPV-HN on 0.8% agarose gel

1. 原毒株 original strain; 2，3，4. 虫体克隆株 *in vivo* cloned strain; M: 标准分子量 *Eco* T14 I digest λDNA; S1 ~ S10: 病毒基因组第 1 ~ 10 dsRNA 片段 viral genome segments 1 to 10

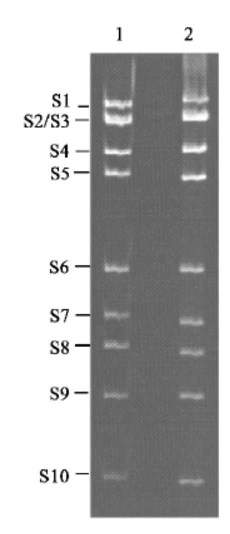


图 2　马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株和家蚕质型多角体病毒 1 型的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 2　Electrophoresis of DpCPV-HN and BmCPV-1 on 5% polyacrylamide gel

1. 马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株 DpCPV-HN; 2. 家蚕质型多角体病毒 1 型 BmCPV-1; S1 ~ S10: 病毒基因组第 1 ~ 10 dsRNA 片段 viral genome segments 1 to 10

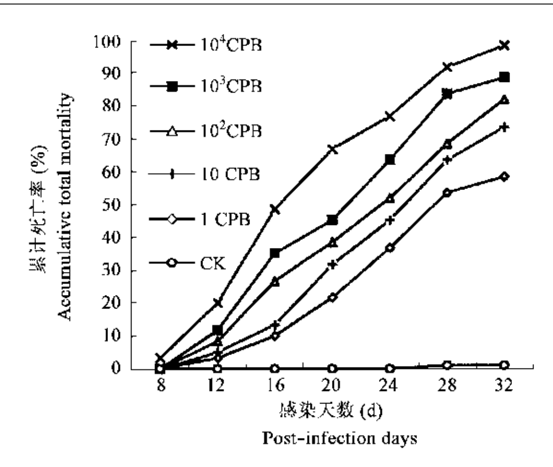
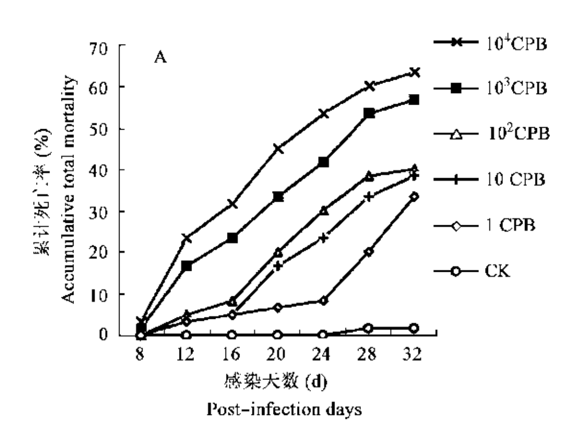


图 3　家蚕质型多角体病毒感染家蚕 F_1 代幼虫累计死亡率随感染时间的变化曲线

Fig. 3　The accumulative larval mortalities of F_1 *B. mori* infected by BmCPV-1 with post-infection days

图 4（A）反映了马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染家蚕春蕾 × 镇珠杂种 F_1 代 4 或 5 日龄幼虫的累计死亡率随感染时间的变化关系。1、10、10^2、10^3 和 10^4 CPB 的马尾松毛虫质型多角体病毒感染 F_1 代幼虫，在感染 32 天后幼虫死亡率分别为 33.3%、38.3%、40.0%、56.7% 和 63.3%，与此相应的空白对照幼虫死亡率为 1.1%。可见，马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株对家蚕春蕾 × 镇珠杂种 F_1 代的致病性远不如家蚕质型多角体病毒。10^4 CPB 的马尾松毛虫质型多角体病毒添毒 F_1 代幼虫，添毒 8 天幼虫开始死亡，死亡率为 3.3%；添毒 12、16、20、24 和 28 天，校正死亡率分别为 23.3%、31.7%、45.0%、53.3% 和 59.6%，求得该组 LT-p 方程为 $Y = 1.2507 + 2.7662X$（图 5 和表 1），50%致死时间（LT_{50}）为 22.7 天。10^3 CPB 的马尾松毛虫质型多角体病毒添毒 F_1 代幼虫，添毒 12、16、20、24 和 28 天，校正死亡率分别为 16.7%、23.3%、33.3%、41.7% 和 52.8%，求得该组 LT-p 方程为 $Y = 0.9638 + 2.7966X$（图 5 和表 1），LT_{50} 为 27.7 天。图 4（B）反映了马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染家蚕春蕾 × 镇珠杂种 F_2 代 4 或 5 日龄幼虫的累计死亡率随感染时间的变化关系。1、10、10^2、10^3 和 10^4 CPB 的马尾松毛虫质型多角体病毒感染 F_2 代幼虫，在感染 32 天后幼虫死亡率分别为 43.3%、50.0%、60.0%、63.3% 和 78.3%，与此相应的空白对照幼虫死亡率为 1.7%。值得注意的是，F_2 代幼虫（F_1 代已被 DpCPV-HN 感染）在清水添食的情况下，仍有 31.7%的幼虫死亡。10^4 CPB 的马尾松毛虫质型多角体病毒添毒 F_2 代幼虫，添毒 12、16、20、24 和 28 天，校正死亡率分别为 16.7%、41.7%、53.3%、65.0% 和 76.7%，该组的 LT-p 方程为 $Y = -0.6082 + 4.3827X$（图 5 和表 1），LT_{50} 为 19.0 天，与 F_1 代的 22.7 天相比，提前 3.7 天。10^3 CPB 的马尾松毛虫质型多角体病毒添毒 F_2 代幼虫，添毒 12、16、20、24 和 28 天，校正死亡率分别为 10.0%、21.7%、33.3%、46.7% 和 61.7%，该组的 LT-p 方程为 $Y = -0.8315 + 4.1841X$，LT_{50} 为 24.8 天，与 F_1 代的 27.7 天相比提前 2.9 天。10^2 CPB 的马尾松毛虫质型多角体病毒添毒 F_2 代幼虫，添毒 12、16、20、24 和 28 天，校正死亡率分别为 8.3%、20.0%、30.0%、41.7% 和 56.7%，其 LT-p 方程为 $Y = -0.9089 + 4.1727X$（图 5 和表 1），LT_{50} 为 26.1 天。上述回归方程经卡方测验均符合实际。显然，



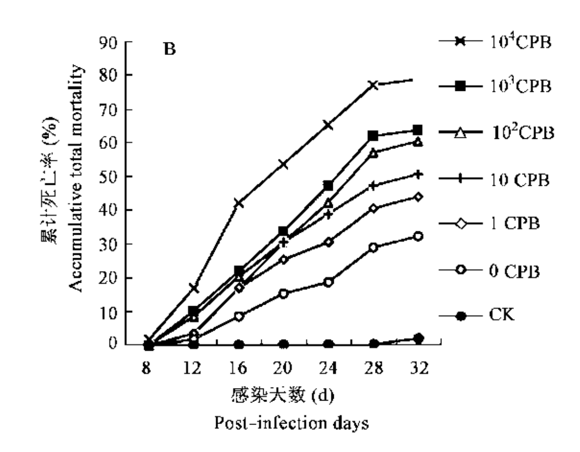


图 4　马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株分别感染家蚕 F_1 代（A）和 F_2 代（B）幼虫累计死亡率随感染时间的变化曲线

Fig. 4　The accumulative larval mortalities of F_1 (A) and F_2 (B) *B. mori* infected by DpCPV-HN with post-infection days

用不同浓度的马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株添毒液处理 F_1 代及 F_2 代 4 或 5 日龄家蚕幼虫，添毒剂量越高，LT_{50} 越小；添毒剂量相同时，其 LT_{50} 值 F_2 代小于 F_1 代。t 测验法分别测验两个回归系数间的显著性差异，结果表明回归系数 4.3827 与 2.7662、4.1841 与 2.7966 均达到极显著水平（$P \leqslant 0.01$）。

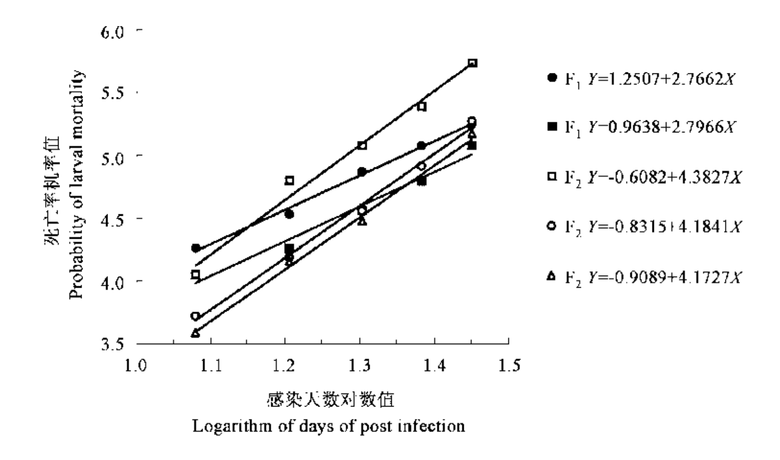


图 5　马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株分别感染家蚕 F_1 代和 F_2 代幼虫的 LT-p 线

Fig. 5　The LT-p lines of F_1 and F_2 *B. mori* infected by DpCPV-HN

表 1　马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株分别感染家蚕 F_1 代和 F_2 代幼虫的 LT-p 回归分析

Table 1　The LT-p regression equations of F_1 and F_2 *B. mori* infected by DpCPV-HN

世代 Generation	感染剂量 Dose of infection (CPB)	不同感染天数的校正死亡率（%） Corrected mortality at different days of infection (%) 12 d	16 d	20 d	24 d	28 d	回归方程 Regression equation ($Y = a + bX$)	相关系数 Relative coefficient	χ^2	LT_{50} (d) (95% CL)
F_2	10^2	8.3	20.0	30.0	41.7	56.7	$-0.9089 + 4.1727X$	0.997	0.172	26.1 (23.9～28.4)
	10^3	10.0	21.7	33.3	46.7	61.7	$-0.8315 + 4.1841X$	0.997	0.311	24.8 (22.7～27.0)
	10^4	16.7	41.7	53.3	65.0	76.7	$-0.6082 + 4.3827X$	0.992	0.896	19.0 (17.6～20.6)
F_1	10^3	16.7	23.3	33.3	41.7	52.8	$0.9638 + 2.7966X$	0.987	0.356	27.7 (24.5～31.4)
	10^4	23.3	31.7	45.0	53.3	59.6	$1.2507 + 2.7662X$	0.997	0.275	22.7 (20.1～25.6)

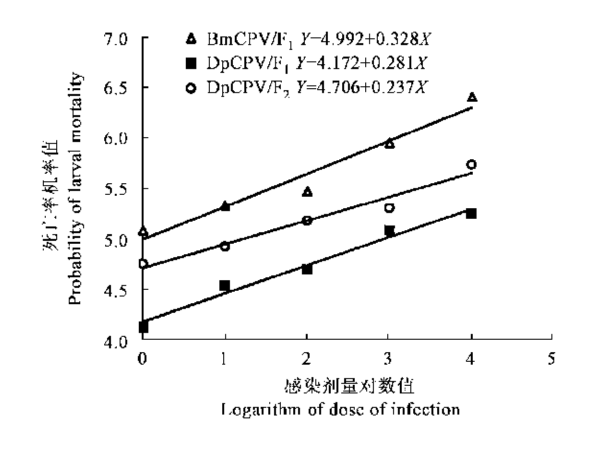


图 6　马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株和家蚕质型多角体病毒分别感染家蚕杂种幼虫的 LD-p 线

Fig. 6　The LD-p lines of F_1 *B. mori* infected by BmCPV-1, and F_1 and F_2 *B. mori* infected by DpCPV-HN

2.2.2　感染剂量对数值-幼虫累计死亡率机率值回归分析：当用 10^4 CPB 的家蚕质型多角体病毒添毒 F_1 代幼虫时，其 LT_{90} 为 27.9 天，所以我们以家蚕质型多角体病毒感染 F_1 代幼虫 28 天各处理剂量的幼虫死亡率为依据（图 3），将各感染剂量分别取对数值，校正死亡率分别转换为机率值，获得其 LD-p 回归方程 $Y = 4.992 + 0.328X$，回归系数 $r = 0.977$，求得回归方程 χ^2 值为 1.476（表 2），经卡方测验该方程亦符合实际。又以马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株分别感染 F_1 代及 F_2 代幼虫 28 天各处理剂量的幼虫累计死亡率为依据（图 4：A 和 B），将各感染剂量分别取对数值，校正死亡率分别转换为机率值，获得各自的 LD-p 回归方程，分别为 $Y = 4.172 + 0.281X$ 和 $Y = 4.706 + 0.237X$（图 6 和表 2），50% 致死剂量（LD_{50}）分别为 885 和 18

CPB，前者为后者的 49 倍。不言而喻，F_2 代幼虫较 F_1 代幼虫对马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株更为敏感。对两个方程 $Y=4.992+0.328X$ 和 $Y=4.706+0.237X$ 的回归系数进行 t 测验，发现 0.328 与 0.237 差异达显著水平（$0.01<P\leqslant0.05$），表明马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株对家蚕春蕾×镇珠杂种 F_2 代幼虫的致病性不如家蚕质型多角体病毒对家蚕的致病性，且仍有质的区别。

表 2 马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株和家蚕质型多角体病毒分别感染家蚕幼虫的 LD-p 回归分析

Table 2 The LD-p regression equations of *B. mori* larvae infected by DpCPV-HN or BmCPV-1

病毒 Virus	世代 Generation	不同感染剂量的校正死亡率（%） Corrected mortality at different dose of infection					回归方程 Regression equation（$Y=a+bX$）	r	χ^2	LD_{50}（CPB）（95% CL）
		10^0 CPB	10^1 CPB	10^2 CPB	10^3 CPB	10^4 CPB				
DpCPV	F_2	40.0	46.7	56.7	61.7	76.7	$4.706+0.237X$	0.982	0.754	18（5～72）
DpCPV	F_1	19.1	32.6	37.7	52.8	59.6	$4.172+0.281X$	0.989	0.842	885（264～2 956）
BmCPV	F_1	52.8	62.9	68.0	83.1	91.6	$4.992+0.328X$	0.977	1.476	

2.3 马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染家蚕幼虫对其经济性状的影响

如表 3 所示，家蚕春蕾×镇珠杂种 F_1 代和 F_2 代 4 或 5 日龄幼虫被马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染后，其结茧率、化蛹率、全茧量、茧层量和单蛾产卵数与空白对照相比较均受到严重影响，对羽化率的影响次之，影响较小的是茧层率。F_1 代幼虫被不同剂量的马尾松毛虫质型多角体病毒感染后，其结茧率和化蛹率分别相当于空白对照的 37%～67%和 24%～45%，全茧量和茧层量分别相当于空白对照的 54%～65%和 55%～66%，单蛾产卵数相当于空白对照的 45%～56%；F_2 代幼虫被不同剂量的马尾松毛虫质型多角体病毒感染后，其结茧率和化蛹率分别相当于空白对照的 22%～57%和 10%～31%，全茧量和茧层量分别相当于空白对照的 52%～60%和 48%～55%，单蛾产卵数相当于空白对照的 48%～51%。F_2 代添毒区的平均茧层率（18.1%）比空白对照（19.7%）减少了 1.6 个百分点，其变幅为 8%；而 F_1 代的平均茧层率（20.2%）比空白对照区却增加了 0.5 个百分点，其变幅为 2.5%。表 4 则表明，F_2 代、F_1 代羽化率与病毒感染剂量呈负相关，且分别达显著和极显著水平；结茧率、化蛹率与病毒感染剂量也呈负相关，但均未达显著水平；全茧量、茧层量、茧层率和单蛾产卵数与病毒感染剂量无显著关联。

表 3 马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株分别感染家蚕 F_1 代和 F_2 代幼虫对其经济性状的影响

Table 3 Affect of DpCPV-HN on the economic traits of F_1 and F_2 *B. mori*

世代 Generation	感染剂量 Dose of infection（CPB）	结茧率 RC（%）	全茧量 CW（g）	茧层量 CSW（g）	茧层率 RCSW（%）	化蛹率 RP（%）	羽化率 RMP（%）	单蛾产卵数（粒/蛾） NESFM（grain/moth）					
								1	2	3	4	5	Average
	DpCPV												
F_2	0	68.3	0.83	0.15	18.1	51.7	80.6	381	342	250	241	239	290 ± 30
	10^0	56.7	0.78	0.14	17.9	30.0	77.8	347	325	268	232	210	276 ± 26
	10^1	50.0	0.87	0.15	17.2	23.3	78.6	315	294	247	225	220	260 ± 19
	10^2	38.3	0.88	0.15	17.0	20	66.7	324	257	239	–	–	273 ± 26
	10^3	36.7	0.83	0.16	19.3	15	55.6	315	237	–	–	–	276 ± 39
	10^4	21.7	0.77	0.15	19.5	10	33.3	–	–	–	–	–	–
	平均值 average			0.83	0.15	18.1							275
F_1	10^0	66.7	0.95	0.19	20	43.3	92.4	368	318	292	275	271	304 ± 18
	10^1	61.7	0.84	0.16	19.0	41.7	87.9	330	262	258	258	257	273 ± 14
	10^2	60.0	0.83	0.17	20.5	38.3	87.0	319	275	260	249	221	265 ± 16
	10^3	43.3	0.81	0.16	19.8	30	77.8	326	258	221	210	201	243 ± 23
	10^4	36.7	0.79	0.16	20.3	23.3	42.9	307	273	201	–	–	260 ± 31
	平均值 average			0.84	0.17	20.2							270
	清水对照 Disinfected water												
F_1	0	98.9	1.47	0.29	19.7	95.5	97.7	637	559	551	485	477	542 ± 29

RC：结茧率 ratio of cocoons；CW：全茧量 cocoon weight；CSW：茧层量 cocoon shell weight；RCSW：茧层率 ratio of cocoon shell weight；RP：化蛹率 ratio of pupae；RMP：羽化率 ratio of moths to pupae；NESFM：单蛾产卵数 number of eggs from single female moths.

表 4　家蚕经济性状与马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株感染剂量的关系

Table 4　The correlations between the economic traits of F_1 and F_2 *B. mori* and inoculation doses of DpCPV-HN

经济性状 Economic traits	相关系数 Relative coefficient	
	F_1	F_2
结茧率 ratio of cocoons	−0.794	−0.824
化蛹率 ratio of pupae	−0.847	−0.755
羽化率 ratio of moths to pupae	−0.984**	−0.906*
全茧量 cocoon weight	−0.529	−0.626
茧层量 cocoon shell weight	−0.386	0.081
茧层率 ratio of cocoon shell weight	0.368	
单蛾产卵数 number of eggs from single female moth	−0.297	

* 显著相关 significantly relative,

** 极显著相关 highly significantly relative.

3　讨论

陶粮等（1988）曾对 7 株不同来源的松毛虫质型多角体病毒样品进行了初步的基因组 RNA 图谱比较，发现松毛虫质型多角体病毒在 3%聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上至少有两种不同的类型，而且存在两种类型混合的电泳图谱。本研究中用虫体克隆方法对马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株原毒株进行分离纯化，以期获得其不同的电泳谱型。虫体克隆用低剂量（例如引起 5%的幼虫死亡的剂量）的病毒感染幼虫时，绝大多数的感染是由单个病毒的繁殖引起，后收集单条死虫所含的病毒，分离纯化到单一基因型的病毒。Smith 和 Crook（1988）首次报道了用虫体克隆的方法分离野生型菜粉蝶 *Artogeia rapae* 颗粒体病毒及舞毒蛾 *Lymantria dispar* 多核衣壳核型多角体病毒的不同基因型，这种方法在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 多核衣壳核型多角体病毒（Munoz *et al*., 1996）和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 单核衣壳核型多角体病毒（孙修炼等，1998）的基因型分离中也成功得到应用。但虫体克隆的方法用于质型多角体病毒基因型的分离纯化至今还未曾见到报道。虫体克隆纯化后的马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株经鉴定为 1 型质型多角体病毒，证明 1 型是松毛虫质型多角体病毒中普遍存在的电泳型（陶粮等，1988）。尽管用虫体克隆方法没有成功地分离出马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株的不同电泳谱型，但经虫体克隆后获得的单株马尾松毛虫质型多角体病毒的基因型较为单一，将研究工作向前推进了一步。

以家蚕春蕾×镇珠杂种 F_1 代和 F_2 代 4 或 5 日龄幼虫进行毒力试验，结果表明：马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株对家蚕有毒性，但毒性不及家蚕质型多角体病毒，且毒性差异显著；家蚕 F_2 代较 F_1 代幼虫对马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株更敏感，其主要原因可能是家蚕卵面带毒所致。不同龄期的家蚕幼虫对质型多角体病毒感染的抵抗性有差异，在以不同龄期的家蚕幼虫作为添毒对象所做的不同试验中，F_2 代对病毒的敏感性可能会有所不同。本试验中家蚕品种是对质型多角体病毒较为敏感的春蕾×镇珠，但是家蚕不同品种间对质型多角体病毒感染的抵抗性差异很大（徐安英等，2002），如果试验材料是对质型多角体病毒感染抗性较强的家蚕品种，那么对 F_2 代的此种影响又可能不同。若以松毛虫作为添毒对象，对 F_2 代的此种影响是否仍将适用？如果适用，这对松毛虫的防治来说，可谓是一种积极的正面效应。尽管马尾松毛虫质型多角体病毒对家蚕毒性较家蚕质型多角体病毒低，但在林业生产规划与蚕业生产规划时还应妥善考虑，宜尽量相互避开，以保证松毛虫病毒综合防治应用与蚕业生产的协调发展。

黄君霆（1979）报道家蚕对家蚕质型多角体病毒感染抵抗性与茧质（全茧量、茧层量和茧层率）无显著相关性。本研究表明全茧量、茧层量、茧层率、单蛾产卵数与马尾松毛虫质型多角体病毒感染剂量无显著关联。

参考文献（References）

Belloncik S, 1989. Cytoplasmic polyhedrosis virus – Reoviridae. *Advances in Virus Research*, 36: 173 – 209.

Chen C J, Wang Z X, Liu G, Gao Z H, Tao L, Chen J Y, Wang Z N, 1988. Studies on introduction and utilization of the pine caterpillar *Dendrolimus spectabilis* CPV. *Forestry Research*, (1): 14 – 24. [陈昌洁，王志贤，刘革，高志和，陶粮，陈建寅，王震南，1988. 赤松毛虫质型多角体病毒的引进和利用研究. 林业科学研究，(1): 14 – 24]

Chen C J, 1990. Integrated Management of Pine Caterpillars in China. Beijing: China Forestry Publishing House. 214 – 308. [陈昌洁，1990. 松毛虫综合管理. 北京：中国林业出版社. 214 – 308]

Francki R I B, Fauquet C M, Knudson D L, Brown F, 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* Suppl. 2, Springer, Vienna. 1 – 450.

Guangdong Institute of Forestry , 1974 . Primary studies on *Dendrolimus*

punctatus polyhedrosis virus. *Forestry Science and Technology*, (10): 13. [广东省林业科学研究所, 1974. 马尾松毛虫多角体病毒研究初报. 林业科技通讯, (10): 13]

Holmes I H, Boccardo G, Esters M K, Furuichi M K, Hoshino Y, Joklik W K, McCrae M, Mertens P P C, Milne G, Samal K S K, Shikata E, Winton J R, Uyeda I, 1995. Family Reoviridae. In: Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, Ghabrial S A, Jarvis A W, Martelli G P, Mayo M A, Summers M D eds. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer, Wien. 208 – 237.

Huang J T, 1979. Study on the resistibility to *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus among silkworm breed. *Acta Sericologica Sinica*, 5 (3): 146 – 151. [黄君霆, 1979. 家蚕品种对细胞质型多角体病毒抵抗性的初步研究. 蚕业科学, 5 (3): 146 – 151]

Laboratory of Electronic Microscope of Insect Major of Biology Faculty in Zhongshan University, 1976. Studies on some characterizations of fine structure, pathology and biochemistry of *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Zhongshan Univ*. (Nat. Sci. Ed.), (4): 11. [中山大学生物系昆虫专业电镜室, 1976. 马尾松毛虫幼虫质型多角体的研究简报. 中山大学学报(自然科学版), (4): 11]

Lu H S, 2001. Molecular Biology of Insect Viruses. Beijing: China Agricultural ScienTech Press. 411 – 442. [吕鸿声, 2001. 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科技出版社. 411 – 442]

Mertens P P C, Crook N E, Rubinstein R, Pedley S, Payne C C, 1989. Cytoplasmic polyhedrosis virus classification by electrophoretype: validation by serological analyses and agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Virol*., 70: 173 – 185.

Munoz D M, Arif B, Krell P, 1996. Genomic variation among *in vivo* cloned genotypes of a Spanish field isolate of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (SeMNPV). Abstract of 29th Annual Meeting of SIP, Cordoba, Spain. 56.

Payne C C, Rivers C F, 1976. A provisional classification of cytoplasmic polyhedrosis viruses based on the sizes of the RNA genome segments. *J. Gen. Virol*., 33: 71 – 85.

Payne C C, Mertens P P C, 1983. Cytoplasmic polyhedrosis virus: In: The Reoviridae. Joklik W K ed. The Reoviridae. New York: Academic Press. 425 – 504.

Shen Z J, Yue Y X, Chen M Q, Su D M, 1994. *In vitro* replication of *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus in different insect cell lines. *Chinese J. Virol*., 10: 44 – 50. [沈中建, 乐云仙, 陈梅琴, 苏德明, 1994. 马尾松毛虫质型多角体病毒在昆虫细胞系中的离体增殖研究. 病毒学报, 10: 44 – 50]

Smith I R L, Crook N E, 1988. *In vivo* isolation of baculovirus genotypes. *Virology*, 166: 240 – 244.

Sun X L, Zhang G Y, Zhang Z X, Hu Z H, 1998. *In vivo* cloning of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genotypes. *Virologica Sinica*, 13 (1): 83 – 88. [孙修炼, 张光裕, 张忠信, 胡志红, 1998. 中国棉铃虫核型多角体病毒不同基因型的虫体克隆. 中国病毒学, 13 (1): 83 – 88]

Tao L, Chen C J, Wang Z X, Gao Z H, Wang M M, Cai X Y, 1988. A study on the comparison of RNA genome segments of seven cytoplasmic polyhedrosis viruses of *Dendrolimus* spp. *Scientia Silvae Sinicae*, 24: 28 – 33. [陶粮, 陈昌洁, 王志贤, 高志和, 王牧牧, 蔡秀玉, 1988. 七株松毛虫质型多角体病毒 RNA 基因图谱比较研究. 林业科学, 24: 28 – 33]

Wang Q, Zhang J M, Wen L, Yang J, Hu Y Y, 2002. Cloning and sequencing of *Dendrolimus punctatus* Wenshanensis cytoplasmic polyhedrosis virus (DpwCPV) polyhedrin gene. *J. Wuhan Univ*. (Nat. Sci. Ed.), 48 (4): 475 – 480. [王琼, 张珈敏, 文力, 杨娟, 胡远扬, 2002. 文山松毛虫质型多角体病毒 (DpwCPV) 多角体蛋白基因的 cDNA 克隆及序列分析. 武汉大学学报 (理学版), 48 (4): 475 – 480]

Xu A Y, Li M W, Lin C Q, Zhang Y H, Hou C X, 2002. The comparison of the resistibility to *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus among silkworm germplasm resources. *Acta Sericologica Sinica*, 28 (2): 157 – 159. [徐安英, 李木旺, 林昌麒, 张月华, 侯成香, 2002. 家蚕品种资源对质型多角体病毒抵抗性的初步比较试验. 蚕业科学, 28 (2): 157 – 159]